

AD

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 58-201994

(43)Date of publication of application : 25.11.1983

(51)Int. Cl.

C12P 21/02

C12N 15/00

// A61K 39/395

(C12P 21/02

C12R 1/91)

(C12N 15/00

C12R 1/91)

(21)Application number : 57-084843 (71)Applicant : HAGIWARA
HIDEAKI(22)Date of filing : 21.05.1982 (72)Inventor : HAGIWARA
HIDEAKI

(54) METHOD FOR PRODUCING ANTIGEN-SPECIFIC HUMAN IMMUNOGLOBULIN

(57)Abstract:

PURPOSE: To produce and collect human immunoglobulin efficiently on the outside of a body, by utilizing a hybridized cellular clone of two human B-cells having different abilities to produce the immunoglobulin.

CONSTITUTION: (A) A human B-cell having the ability to produce immunoglobulin, e.g. B-cell of human lymphocytes sensitized by a pathogenic antigen, is brought into contact with (B) a human

B-cell, having substantially no ability to produce the immunoglobulin, and capable of self-multiplying and stopping the multiplication (or dying) in the presence of a specific reagent, e.g. in the presence of a plasmogamy accelerator, e.g. Sendai virus or polyethylene glycol, to produce the aimed hybridized cell (hybridoma) between the (A) the human B-cell and (B) the human B-cell. The resultant hybridized cell is then cultivated in a culture medium stopping the multiplication (or exterminating) the human B-cells (A) and (B), and the resultant immunoglobulin having the same character as that of (A) the above-mentioned B-cell is collected from the resultant hybridized cellular clone.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's
decision of rejection]

[Kind of final disposal of
application other than the
examiner's decision of rejection
or application converted
registration]

[Date of final disposal for
application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against
examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal
against examiner's decision of
rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998, 2003 Japan Patent Office

Patent & Utility Model Concordance

MENU**SEARCH****NEWS****HELP**

Document Number list

	1	2	3	4	5
Application Number	57-084843(1982)				
Unexamined Publication Number	JP,58-201994,A(1983)				
Examined Publication Number	JP,01-059878,B(1989)				
Registration Number	JP,1940835,B				

Please choose a Kind code with Display Type.

Kind code **Display Type**

List**Stored Data**

⑫ 特許公報(B2)

平1-59878

⑤ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公告 平成1年(1989)12月20日

C 12 P 21/00
 C 12 N 5/00
 15/00
 // A 61 K 39/395
 C 07 K 15/04
 (C 12 P 21/00
 C 12 R 1:91)

D-6712-4B
 B-8515-4B
 C-8717-4B
 8829-4C
 8318-4H

AD

発明の数 1 (全11頁)

⑥ 発明の名称 抗原特異的ヒト免疫グロブリンの生産方法

⑦ 特 願 昭57-84843

⑧ 公 開 昭58-201994

⑨ 出 願 昭57(1982)5月21日

⑩ 昭58(1983)11月25日

⑪ 発 明 者 萩 原 秀 昭 兵庫県宝塚市平井山荘4-14

⑫ 出 願 人 ザ・リージェンツ・オブ・ザ・ユニバーシテイ・オブ・カリフォルニア
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 94720 パークレイ・ユニバーシテイ・アベニュー 2200

⑬ 代 理 人 弁理士 小田島 平吉

審 査 官 小 沢 誠 次

1

2

⑭ 特許請求の範囲

1 (1) 免疫グロブリン生産能を有するヒトB-セル(A)を含有するヒト細胞群と、

(2)(i) 適当な培地中で自己増殖性を有し、

(ii) 特定の試薬の存在下又は特定の成分の不存下で増殖停止又は死滅する感受性を有し、且つ

(iii) 免疫グロブリン生産能を実質的に欠損している

永久分裂能をもつ骨髓様のヒトB-セル(B)を含有するヒト細胞群とを、

(3) 人間の体外で融合してヒトB-セル(A)とヒトB-セル(B)との融合細胞を産生し、得られる融合細胞を、上記(1)のヒト細胞群及び上記(2)のヒト細胞群は増殖停止又は死滅するが該融合細胞は増殖し得る培地中で培養して融合細胞クローンを取得し、

(4) この融合細胞クローンから前記B-セル(A)と同形質の免疫グロブリン含有物質又は免疫グロブリンを採取する

ことを特徴とするヒト免疫グロブリンの生産方法。

2 該ヒトB-セル(A)が、抗原によつて感作され

たヒトリンパ球のB-セルである特許請求の範囲第1項記載のヒト免疫グロブリンの生産方法。

3 該ヒトB-セル(A)が、病原性抗原によつて感作されたヒトリンパ節、ヒトリンパ腺、ヒト骨髓又はヒト脾臓に含有されているB-セルである特許請求の範囲第1項記載の方法。

4 該ヒトB-セル(A)が、病原性抗原によつて感作されたヒト血液中のリンパ球のB-セルである特許請求の範囲第1項記載の方法。

5 該ヒトB-セル(A)が、非病原性抗原によつて感作されたヒトリンパ節、ヒトリンパ腺、ヒト脾臓、ヒト骨髓又はヒト血液中のB-セルである特許請求の範囲第1項記載の方法。

6 該ヒトB-セル(A)が、バクテリア、菌類、カビ類、ビールス、寄生虫、自己抗原及びガン細胞から成る群から選ばれる少なくとも1種の病原性抗原によつて感作されたヒトリンパ節、ヒトリンパ腺、ヒト脾臓、ヒト骨髓又はヒト血液中のリンパ球のB-セルである特許請求の範囲第1項記載の方法。

7 該ヒトB-セル(A)が、酵素、ポリペプチド、蛋白質、糖脂質、多糖類、核酸、ハプテン又は変性ハプテン-感作又は一結合抗原性物質及び細胞

膜抗原性物質から成る群から選ばれる少くとも1種の非病原性抗原によつて感作されたヒトリンパ節、ヒトリンパ腺、ヒト脾臓、ヒト骨髓又はヒト血液中のリンパ球のB-セルである特許請求の範囲第1項記載の方法。

8 該ヒトB-セル(A)が、ヒトリンパ球のB-セルを、ヒト体外で、増殖性因子によつて増殖及び/又は抗原性物質で感作することにより免疫グロブリン生産能が増強されたヒトB-セルである特許請求の範囲第1項記載の方法。

9 該ヒトB-セル(A)が、ヒトリンパ節、ヒトリンパ腺、ヒト脾臓、ヒト骨髓又はヒト血液中のリンパ球から採取し、又はこれをヒト体外で増殖したものから選択したものである特許請求の範囲第1項記載の方法。

10 該ヒトB-セル(B)が、

(イ) 適当な培地中で増殖の倍加時間(ダブリング・タイム)が48時間以内、好ましくは20時間以内の自己増殖性を有し、

(ロ) 特定の試薬の存在下で又は特定の成分の不在下で増殖停止又は死滅する実質的に非可逆的な感受性を有し、且つ

(ハ) 免疫グロブリン生産能を実質的に欠損している

ヒトB-セルである特許請求の範囲第1項記載の方法。

11 該B-セル(B)が、適当な培地及び培養条件下で単一細胞(シングルセル)として増殖可能なものである特許請求の範囲第1項記載の方法。

12 ヒトB-セル(A)とヒトB-セル(B)とを、仙台ウイルス或いはポリエチレングリコールの存在下で融合して、ヒトB-セル(A)とヒトB-セル(B)との融合細胞(ハイブリドーマ)を産生する特許請求の範囲第1項記載の方法。

13 ヒトB-セル(A)とヒトB-セル(B)とを、仙台ウイルス或いはポリエチレングリコール及び血清の存在下で融合してヒトB-セル(A)とヒトB-セル(B)との融合細胞を産生する特許請求の範囲第1項記載の方法。

14 (1) 腫瘍を含む病原性抗原特異的免疫グロブリン生産能を有するヒトB-セル(A)を含有するヒト細胞群と、

(2)(イ) 適当な培地中で自己増殖性を有し、

(ロ) 特定の試薬の存在下又は特定の成分の不在

在下で増殖停止又は死滅する感受性を有し、且つ

(ハ) 免疫グロブリン生産能を実質的に欠損している

5 永久分裂能をもつ骨髓様のヒトB-セル(B)を含有するヒト細胞群を、

(3) 人間の体外で融合してヒトB-セル(A)とヒトB-セル(B)との融合細胞を産生し、得られる融合細胞を、上記(1)のヒト細胞群及び上記(2)のヒト細胞群は増殖停止又は死滅するが該融合細胞は増殖し得る培地中で培養して融合細胞クローンを取得し、

10 (4) この融合細胞クローンから前記B-セル(A)と同形質の免疫グロブリン含有物質又は免疫グロブリンを採取する

15 ことを特徴とする病原性抗原特異的ヒト免疫グロブリン含有物質又は該ヒト免疫グロブリンの生産するための特許請求の範囲第1項記載の方法。

15 (1) 腫瘍を含む病原性抗原特異的免疫グロブリン生産能を有するヒトB-セル(A)を含有するヒト細胞群と、

(2)(イ) 適当な培地中で自己増殖性を有し、

(ロ) 特定の試薬の存在下又は特定の成分の不在下で増殖停止又は死滅する感受性を有し、且つ

(ハ) 免疫グロブリン生産能を実質的に欠損している

ヒトB-セル(B)を含有するヒト細胞群を、

(3) 人間の体外で融合してヒトB-セル(A)とヒトB-セル(B)との融合細胞を産生し、得られる融合細胞を、上記(1)のヒト細胞群及び上記(2)のヒト細胞群は増殖停止又は死滅するが該融合細胞は増殖し得る培地中で培養して融合細胞クローンを取得し、

35 (4) 該融合細胞クローン又はその培養液から、前記病原性抗原が分離できる場合にはその病原性抗原と反応する前記ヒトB-セル(A)と同形質のヒト免疫グロブリンを採し出し、また前記病原性抗原が分離できない場合にはその病原性抗原組織を免疫性物質生産能を有しない生体に植えつけ、該組織を維持した後、その組織に対して或は培養系にもどされた該組織に対して反応する前記ヒトB-セル(A)と同形質のヒト免疫グロブリンを採し出し、該ヒト免疫グロブリンを採

取する

ことを特徴とする特許請求の範囲第14項記載の病原性抗原特異的ヒト単一免疫グロブリンの生産方法。

16 前記ヒトB-セル(A)が、腫瘍患者、殊に癌患者のリンパ節、リンパ腺、脾臓、骨髓又は血液から採取された病原性抗原特異的免疫グロブリン生産能を有するヒトB-セルである特許請求の範囲第14項又は第15項記載の方法。

発明の詳細な説明

本発明は、免疫グロブリン生産能を異にする二種のヒトB-セル、とくに、免疫グロブリン生産能を有するヒトB-セル(A)と免疫グロブリン生産能を実質的に欠損しているヒトB-セル(B)との新しいタイプの融合細胞のクローンをヒト体外で産生し、該クローンから前記ヒトB-セル(A)と同形質の免疫グロブリン含有物質又は免疫グロブリンを採取する抗原特異的ヒト免疫グロブリンの生産方法に関する。生産されるヒト免疫グロブリンは、例えば、人の抗原性病気の予防、治療、診断などの医学及び薬学分野や生化学的試薬、生体高分子の精製試薬などを薬理学分野、生化学分野等の如き広い分野に於て有用である。

更に詳しくは、本発明は

- (1) 免疫グロブリン生産能を有するヒトB-セル(A)を含有するヒト細胞群と、
- (2)(i) 適当な培地中で自己増殖性を有し、
 - (a) 特定の試薬の存在下又は特定の成分の不存在下で増殖停止又は死滅する感受性を有し、且つ
 - (b) 免疫グロブリン生産能を実質的に欠損しているヒトB-セル(B)を含有するヒト細胞群とを、
- (3) 人間の体外で融合してヒトB-セル(A)とヒトB-セル(B)との融合細胞を産生し、得られる融合細胞を、上記(1)のヒト細胞群及び上記(2)のヒト細胞群は増殖停止又は死滅するが該融合細胞は増殖し得る培地中で培養して融合細胞クローンを取得し、
- (4) この融合細胞クローンから前記B-セル(A)と同形質の免疫グロブリン含有物質又は免疫グロブリンを採取することを特徴とする抗原特異的ヒト免疫グロブリンの生産方法に関する。

従来、抗原によつて感作されたマウスB-セルと骨髓性白血病(myeloma)マウスからのマウスB-セルとの融合細胞をマウス体外で形成し、上記抗原に対するマウス免疫グロブリン生産能を有し且つ自己増殖性を有するマウス/マウス融合細胞を形成した報告は知られている(例えば、Nature、Vol.256、1975年、495~497頁；Proc. Natl. Acad. Sci. USA、Vol.75、No. 7、1978年、3405~3409頁、等)。又、抗原によつて感作されたヒトB-セルと骨髓性白血病マウスからのマウスB-セルとの融合細胞を体外で形成し、上記抗原に対するヒト免疫グロブリン生産能を有し且つ自己増殖性を有するヒト/マウス融合細胞を形成した報告も知られている(例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、Vol.77、No.11、1980年、6841~6845頁；The Journal of Immunology、Vol.125、No. 3、1980年、1037~1043頁、等)。

しかしながら、ヒト免疫グロブリン生産能を有する融合細胞を取得しようという上記後者の試みに於ては、経時的に染色体欠落を伴い、前記ヒト免疫グロブリン生産能が経時的に喪失し、免疫グロブリン生産能が極めて不安定である致命的な欠陥を有する。

ヒト免疫グロブリン生産能を有するヒト/ヒト融合細胞を形成する試みとして、抗原としてハシカ・ビールス又はハプテン(hapten)〔2、4-ジニトロフェニル〕によつて感作されたヒトB-セルをドナーとして使用し、これと骨髓性白血病患者からのヒト免疫グロブリン生産能を有するセル・ライン(ヒトB-セル)(親株)との融合細胞をヒト体外で形成し、上記抗原に対するヒト免疫グロブリン生産能を有し且つ自己増殖性を有するヒト/ヒト融合細胞を形成した報告が知られている(Nature、Vol.288、1980年、483~483頁；Proc. Natl. Acad. Sci. USA、Vol.77、No. 9、1980年、5429-5431頁)。

しかしながら、この報文の方法によれば、後者の親株であるセル・ライン(ヒトB-セル)が前者のドナーであるヒトB-セルとは異なるヒト免疫グロブリン生産能を有するために、得られるヒト/ヒト融合細胞は両者のヒトB-セルの免疫グロブリン形成を有するものの混合体となる。このためにかかるヒト/ヒト融合細胞から採取される免疫グロブリンは幾つかの形質の免疫グロブリン

の混合体となり、リンパ球(A)と同形質の免疫グロブリンが一定の特異性形質を維持しながらかつ単一抗体として産生されることが不可能となる。

この結果、例えばリンパ球(A)と同形質の抗原特異的ヒト免疫グロブリンを用いようとしても、他の形質の免疫グロブリンが干渉することとなり、目的とする治療、予防、検査、精製等の遂行が困難となる。

その上、上記の報文で用いられた親株であるセル・ライン（ヒトB-セル）は薬剤感受性が可逆的であつて、感受性を喪失する頻度が高く、一旦このような現象が生じると所望の融合細胞をドナー及び親株として用いたヒトB-セルから分離し、採取することが困難となる。さらに、親株であるセル・ラインの培養中に凝集塊を形成し易く、その結果融合細胞を産生する確率が低いという難点もある。

本発明者は、ドナーとして用いるヒトリンパ球のB-セル〔以下B-セル(A)ともいう〕と同形質の抗原特異的ヒト免疫グロブリンをその一定の形質を維持しつつ生産可能なヒト／ヒト融合細胞を産生し、これから単一形質の免疫グロブリンを生産する目的で研究を行った。

その結果、免疫グロブリン生産能を有するヒトB-セル(A)と、免疫グロブリン生産能を実質的に欠損しているヒトB-セル(B)とを人間の体外で融合することにより新規なヒト／ヒト融合細胞を産生することができること、そして産生されたこのヒト／ヒト融合細胞は該ヒトB-セル(A)の免疫学的形質を有し且つそのような形質を安定に持続し得ることを発見した。更に、この新しいタイプのヒト／ヒト融合細胞を効率よく産生することが容易であつて、且つ融合細胞形成確率も高く、そして体外でヒト免疫グロブリンの大量生産を可能とするユニークなヒト／ヒト融合細胞であることを知った。

上記の新しい諸知見に基いて更に研究を進めた結果、本発明によれば、

- (1) 免疫グロブリン生産能を有するヒトB-セル〔以下ヒトB-セル(A)ともいう〕を含有するヒト細胞群と、
- (2)(i) 適当な培地中で自己増殖性を有し、
- (ii) 特定の試薬の存在下又は特定の成分の不存在下で増殖停止又は死滅する感受性を有し、

且つ

(i) 免疫グロブリン生産能を実質的に欠損している

ヒトB-セル〔以下ヒトB-セル(B)ともいう〕を含有するヒト細胞群

とを人間の体外で融合して、ヒトB-セル(A)とヒトB-セル(B)との融合細胞を産生し、得られる融合細胞を、上記(1)のヒト細胞及び上記(2)のヒト細胞群は増殖停止又は死滅するが該融合細胞は増殖し得る培地中で培養して融合細胞クローンを取得し、この融合細胞クローンからの前記B-セル(A)と同形質の抗原特異的ヒト免疫グロブリン含有物質又は免疫グロブリンを採取することによつて、所望の且つ一定の免疫形質を有するヒト免疫グロブリンを再現性よく取得できることを発見した。

かくして、一人の患者から採られたリンパ球を用いて本発明により生産したが抗体がその本人(Autologous)の抗原及びこれと同形質のヒト抗原に対して特異的に反応することが実験的に判明した。

本発明者の知る限り、前記(1)のヒトB-セルをドナーとして用い、これを前記(2)のヒトB-セルの如く免疫グロブリン生産能を実質的に欠損している親株と、人間の体外で、融合してヒト／ヒト融合細胞を産生させることに成功した例はこれまで全く知られていない。加えて、この融合細胞から生産されるヒト免疫グロブリンが本人(患者)および本人以外のそれと同形質の抗原(組織)と特異的に反応することは未だ報告されていない。

しかるに本発明者は前記(1)の適当なヒトB-セルをドナーとして用い、これを前記(2)の免疫グロブリン生産能を実質的に欠損しているヒトB-セル(親株)と、人間の体外で融合することにより融合細胞を産生することができること、そして産生された融合細胞は親株のB-セルとは試薬又は培地成分に対する感受性が異なり、しかもドナーであるB-セルは増殖能が乏しいために之等のB-セルと分離することが可能であること、さらに分離された融合細胞を別の培地で培養するとその多くのものは増殖が停止し又は死滅するが、その一部には安定に増殖してクローンを形成するものがあること、そしてこのクローンを形成する融合細胞は長期間継代増殖が可能であることを発見するに至った。

従つて、本発明の目的は、新しいタイプの融合細胞のクローンを用いて抗原特異的ヒト免疫グロブリンを生産するユニークな方法を提供するにある。

本発明に於て、融合細胞の産生に用いる免疫グロブリン生産能を有するヒトB-セル(A)は、任意の抗原によつて感作されたヒトリンパ球の免疫グロブリン生産能を有するヒトB-セルであることができる。このようなヒトB-セル(A)は人間の体外では継代的自己増殖性を実質的に有しないものが好ましい。該抗原は病原性抗原であつてもよいし、或は又、非病原性抗原であつてもよい。又、ヒトリンパ球の採取源は適宜に選択でき、たとえば、ヒトリンパ節、ヒトリンパ腺、ヒト脾臓、ヒト血液、ヒト骨髓などを挙げるができる。

本発明に於ては、ヒトB-セル(B)として免疫グロブリン生産能を実質的に欠損しているヒトB-セル(B)を用い、ヒトB-セル(A)として免疫グロブリン生産能を有するヒトB-セル(A)を用いるので、これから生産された融合細胞のクローンから上記ヒトB-セル(A)の生産するヒト免疫グロブリンの形質を適宜選択することにより、所望の抗原特異的ヒト免疫グロブリンを生産することができる利点がある。

本発明に於て、用いる前記ヒトB-セル(A)としては、バクテリア、菌類、カビ類、ビールス、寄生虫、自己抗原、ガン細胞等の病原性抗原によつて感作されたヒトリンパ節、ヒトリンパ腺、ヒト脾臓又はヒト血液中のリンパ球のB-セル；及び酵素、ポリペプチド、蛋白質、糖脂質、多糖類、核酸、ハプテン又は変性ハプテン-感作又は一結合抗原性物質、細胞膜抗原性物質等の非病原性抗原によつて感作されたヒトリンパ節、ヒトリンパ腺、ヒト脾臓又はヒト血液中のリンパ球のB-セルを例示することができる。

本発明に於て、ヒトB-セル(A)は、前記例示の如き採取源から分離採取されたヒトリンパ球のB-セルであつてもよいし、或は又、採取されたヒトリンパ球のB-セルを、ヒト体外で、例えば、増殖性因子によつて増殖及び／又は抗原性物質で感作する、などの手法を利用して得られる免疫グロブリン生産能が増強されたヒトB-セルであつてもよい。このような増殖性因子の例としては、リボポリサツカライド類、レクチン類などを例示

でき、又、抗原性物質としてはヒトB-セル(A)を感作させる抗原として前に例示したような抗原性物質をあげることができる。

上記生産能増強の操作は例えば下記文献により知られており、本発明において利用することができる。Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, Vol.77, pp1139 - 1143(1980) Michael Hoffman ; "Nature", Vol.282, (1979), Robin E. Callard. 好ましい一態様によれば、上記の如き増殖性因子たとえばRPMI-1640(10%仔牛血清含有)を含む液体培地で、前記の如き採取源から分離採取されたヒトB-セル(A)を培養し、次いで該培地に抗原性物質を添加して更に培養してもよいし、または両者を含む液体培地中で培養してもよい。培養条件としては、たとえば、37°Cで約5~7日の如き条件を例示できる。

本発明に於て用いる前記ヒトB-セル(B)は、下記(i)~(iv)の要件を満足するヒトB-セルであれば如何なるものでもよく、適宜に選択利用することができる。

- (i) 適当な培地中で自己増殖性を有し、
- (ii) 特定の試薬の存在下又は特定の成分の不存在下で増殖停止又は死滅する感受性を有し、且つ
- (iii) 免疫グロブリン生産能を実質的に欠損している。

上記ヒトB-セル(B)は、適当な採取源、たとえばヒトリンパ節、ヒトリンパ腺、ヒト脾臓、ヒト血液、ヒト骨髓などのリンパ球から採取し、又はこれをヒト体外で増殖もしくは増殖及び分化したもののから選択することができる。上記(i)、(ii)、及び(iii)の要件を満足するヒトB-セル(B)を直接選択することができるが、操作上の見地からは、上記(i)、(ii)及び(iii)の要件中、一つもしくは二つの要件のみを満足するヒトB-セルを最初に採取し、欠如している他の要件を満足するまで、増殖又は分化等の処理を施すのが好ましい。

例えば、(i)適当な培地中で自己増殖性を有し且つ(ii)免疫グロブリン生産能を実質的に欠損しているが(ii)の性質を有しないB-セルを採取し、これに(ii)特定の試薬の存在下又は特定の成分の不存在下で増殖停止又は死滅する感受性を、ヒト体外で賦与することができる。この態様の実施に際しては、例えば下記文献により公知の手法を利用することができる。Hybridoma in Cancer

Diagnosis and Treatment ed. M. S. Mitchell and H. F. Oettgen Raven Press New York (1982), pp125-132.

たとえば、上記文献に記載の手法を利用して、健康なヒト脾臓からバイオプシー (Biopsy) により、リンパ芽球、骨髄性白血病患者のリンパ球などの如きリンパ系細胞をとり、その中の免疫グロブリン生産能を実質的に有しないBセルリンパ球を選別分離し、たとえば6-チオグアニン、8-アザグアニン、5-ブロモデオシウリジンの如き酵素変異原含有培地で培養すると、選当な培地中で自己増殖性を有し、免疫グロブリンを産生せず且HAT培地中では死滅する感受性を有するヒトB-セル(B)を得ることができる。例えば、後期実施例で利用したヒトBセルUC729-6は上記リンパ芽球を用いて6-チオグアニン含有培地で培養して得ることができる。

上記ヒトBセルUC729-6は工業技術院微生物工業技術研究所長発行の奇託受託拒否通知書を受けた。

又、例えば、(i)適当な培地中で自己増殖性を有し、(ii)及び(iii)の性質を有しないヒトB-セルを採取し、これに上記と同様な手法で(ii)の性質を賦与したのち、それを培養増殖させ、増殖物をそれ自体公知のサブ・クローニングの手法によりスクリーニングして(iii)の性質を満足するヒトB-セルをえらび出すことができる。

ヒトB-セル(B)の要件(i)の自己増殖性は、ヒトB-セル(A)とヒトB-セル(B)との融合細胞に受継がれる形質であるので、できる限り長期間の自己増殖性、好ましくは実質的に永久的な自己増殖性を有するヒトB-セル(B)を選択するのが好ましい。工業的には、少なくとも100回、より好ましくは少なくとも200回、とくには少なくとも500回以上の自己増殖を繰り返すものを選択するのがよい。

更に、要件(i)の自己増殖性に関連して、自己増殖の倍加時間 (ダブリング・タイム) が約48時間以下、更には約20時間以下であるような自己増殖性を有するヒトB-セル(B)の利用が好ましい。この倍加時間が小であるという性質も、ヒトB-セル(A)とヒトB-セル(B)との融合細胞に受継がれる形質であるので、融合細胞のクローンの生産する所望のヒト免疫グロブリンの生産量の増大を達成

できることになる。従つて、前記自己増殖性が長期間維持され且つ上記倍加時間が小であるヒトB-セル(B)を選択することによつて、とくに優れたヒト免疫グロブリンの生産方法を提供することができる。

又、要件(ii)の特定の試薬の存在下で又は特定の成分の不存在下で増殖停止又は死滅する感受性は、後に詳しく述べる所望の融合細胞クローンを取得するためのスクリーニングを可能とするために必要な性質である。上記特定の試薬の例としては、アミノプテリン、アランシン、ウアバインなどを例示することができる。

上記感受性は、ヒトB-セル(A)とヒトB-セル(B)とから産生された融合細胞に於て、可逆的に要件(ii)を満足しない状態に戻る所謂“バック・ミューテーション”(復帰突然変異)を生ずる場合があるので、本発明においては、特定の試薬の存在下で又は特定の成分の不存在下で増殖停止又は死滅する非可逆的な感受性を有するヒトB-セル(B)を選ぶのが有利である。

本発明で融合細胞 (ハイブリドーマ) を産生するのに用いる上述のヒトB-セル(B)は、適当な培地及び培養条件下でシングルセルとして増殖可能なもの、すなわちセル凝集塊を形成しないことが望ましい。ヒトB-セル(B)の培地としては、例えば、仔牛血清、ヒト血清、新生仔牛血清、ウマ血清などの如き血清含有RPMI-1640培地などを例示できる。又、培養条件としては、例えば、5% CO₂の存在下、37°Cの条件を例示できる。

本発明方法に於ては、上述の如き免疫グロブリン生産能を有するヒトB-セル(A)を含有するヒト細胞群と、上述の如き(i)、(ii)及び(iii)を満足するヒトB-セル(B)を含有するヒト細胞群とを、人間の体外で融合してヒトB-セル(A)とヒトB-セル(B)との融合細胞を産生する。

この融合細胞を産生する融合操作は公知の如何なる方法でもよい。融合操作は、液媒中、融合促進剤の存在下に、ヒトB-セル(A)とヒトB-セル(B)とを接触させて行うことができる。このような融合促進剤の例としては、仙台ウイルス(HVJ)、ポリエチレングリコールなどを例示することができる。例えば、水性媒体中、上記例示の如き融合促進剤の存在下、所望によりおだやかな攪拌を加えて系を均一にし、次いで、ヒトB-

セル(A)の1ケとヒトB-セル(B)の1ケから成る融合細胞が産生される時間、たとえば数分間のオーダーで静置することにより、所望の融合細胞が産生できる。液媒の例としては水、生理食塩水、5%ジメチルスルホキシド水溶液、5%グリセロール水溶液などを例示することができる。

所望の融合細胞が産生された系を、例えば、遠心分離して細胞群を採取し、再び適当な培地に、たとえば前記例示の如き血清含有RPMI-1640液体培地中に前記例示の如き試薬を加え、採取した該細胞群を分散させ、この分散液を例えばマイクロ・タイター・プレートの穴に、夫々、一定量ずつ分取注入し、例えば、5%CO₂の存在下、37℃で培養を行う。各穴中の培養液を、例えば3日毎に新しい培養液と取りかえ、例えば2週間培養を続けたのち、顕微鏡下で融合細胞の有無を検べ、コロニーの認められた試料の培養液を採取し、ヒト免疫グロブリンの有無を、例えば¹²⁵Iを用いたラジオ・イミュノ・アッセイにより検出することができる。

このようにして、ヒト免疫グロブリンの生産の認められたコロニーを、新しい培養液に移して培養し、融合細胞を増殖させることにより融合細胞クローンを取得することができる。更に、必要に応じて、サブ・クローニングして、所望のヒトB-セル(A)と同形質の抗原特異的ヒト免疫グロブリン生産性クローンを得ることができる。

本発明方法によれば、上述のようにして得られる融合細胞クローンを適当な培地、たとえば10%血清含有RPMI-1640培地で培養し、培養液を採取することによりヒトB-セル(A)と同形質の抗原特異的免疫グロブリン含有物質を得ることができる。更に、所望により、精製して精製免疫グロブリンをすることもできる。精製は、たとえば、硫酸分画法、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、電気泳動法などの如き生体液から免疫グロブリンを採取、精製する際に利用できると同様な精製手段を利用することができる。

本発明によれば、前述した融合細胞クローン又はその培養液からヒトB-セル(A)と同形質の抗原特異的ヒト免疫グロブリン含有物質又は該免疫グロブリンを取得する場合、抗原が分離できる場合にはその抗原と反応するヒト免疫グロブリン(抗

体)を探し出し、また抗原が分離できない場合には抗原性組織(例えば癌組織)を一度、免疫物質生産能を欠如するか若しくは極めて弱い生体例えばヌード・マウス(nude mouse)等に植えつけ組織を維持した後、その組織に対して或いは培養系にもどされた組織に対して反応するヒト免疫グロブリン(抗体)を探し出し、これを分離するのが有利である。

本発明によれば、かくすることにより、抗原、殊に病原性抗原に対して特異的ヒト単一免疫グロブリンを生産することができる。

本発明方法の実施に際して、ヒトB-セル(A)は、既述のように、任意の抗原によつて感作されたヒトリンパ球の免疫グロブリン生産能を有するB-セルであつてもよい。

このようなヒトB-セル(A)は人間の体外では自己増殖性を実質的に示さず、たとえば高々数回の分裂を行う場合がある程度のものが好ましい。しかしながら、本発明に於ては、ヒトB-セル(A)として、体外で自己増殖性を有するヒトB-セル(A)、たとえば骨髓性白血病患者のリンパ球のB-セルも利用できる。このような場合には、例えばヒトB-セル(A)に対する抗血清で且つヒトB-セル(B)とは結合しない抗血清をさらに含有する上記培地を用いて、上記と同様に行うことができる。

本発明の好適態様によれば、前記(1)として抗原特異性免疫グロブリン生産能を有するヒトB-セル(A)を含有するヒト細胞群を用いる。このようなヒトB-セル(A)はヒト体外では実質的な自己増殖性を示さないものが有利である。該抗原は病原性抗原であつても非病原性抗原であつてもよい。このような好適態様の一例として下記の如き方法を例示することができる。

(1) 抗原特異的、好ましくは病原性抗原特異的、さらに好ましくは腫瘍(癌を包含する最も広義の意味である)特異的免疫グロブリン生産能を有するヒトB-セル(A)を含有するヒト細胞群と、

(2) (1) 適当な培地中で好ましくは長期間自己増殖性好ましくは実質的に永続的な自己増殖性を有し、

(ロ) 好ましくは特定の試薬の存在下で増殖停止又は死滅する感受性を有し、且つ

イ) 免疫グロブリン生産能を実質的に欠損し

ている

ヒトB-セル(B)を含有するヒト細胞群とを、

- (3) 人間の体外で融合してヒトB-セル(A)とヒトB-セル(B)との融合細胞を産生し、得られる融合細胞を上記(1)の特定の試薬を含有する培地中で培養して融合細胞クローンを取得し、
- (4) この融合細胞クローンから前記B-セル(A)と同形質の抗原特異的ヒト免疫グロブリン含有物質又はかかるヒト免疫グロブリンを採取することを特徴とするヒト免疫グロブリンの生産方法。

本発明方法に於て、前記ヒトB-セル(A)とヒトB-セル(B)とを人間の体外で融合して産生される融合細胞(ハイブリドーマ)の例として、後に実施例に示すヒト/ヒトハイブリドーマ(Human hybridoma) CLN/SUZH5株及びヒト/ヒトハイブリドーマCLN/SUZH11株の細胞学的性質を以下に示す。

ヒト/ヒトハイブリドーマCLN/SUZH5:-

- (1) 染色体数92
- (2) ヒト免疫グロブリンM(IgM) 分泌(生産)
- (3) 倍加時間(ダブリング・タイム) 37時間
- (4) リンパ球系シングルセル

ヒト/ヒトハイブリドーマCLN/SUZH11:-

- (1) 染色体数92
- (2) ヒト免疫グロブリンG(IgG) 分泌(生産)
- (3) 倍加時間37時間
- (4) リンパ球系シングルセル

上記両者のヒト・ハイブリドーマは、工業技術院微生物工業技術研究所長発行の寄託受託拒否通知書を受けた。

本発明方法によれば、臨床及び基礎医学分野をはじめ製薬及び薬理学的分野、生化学分野その他の広い分野においてユニークな且つ注目すべき有用性を有するヒト免疫グロブリンを、とくに所望の且つ一定形質の抗原特異的ヒト免疫グロブリンを、体外に於て工業的に有利に製造することができる。

かくして、本発明方法に従つて、ヒト/ヒト・ハイブリドーマから生産される単一抗体(モノクロナル抗体)は、例えば癌に代表されるような人間に起る治療困難な疾患の処置および治療を包含する製薬、医学、薬理学、生化学その他の広い分

野において新規且つ注目すべき有用性を有する。

例えば、マウス/マウス・モノクロナル抗体では、人間にマウス抗体を投与することになるから、当然、アレルギー症状やショック症状を伴う危険が予想されるし、又、ヒト/マウス・モノクロナル抗体では、上記と同様の危険のほかにはハイブリドーマの安定性に難点があるため、均一の標品を長期にわたつて生産させることはできない。更に、ヒト/ヒト・モノクロナル抗体の場合に於ても、細胞融合に用いる親株であるヒトB-セル(B)に該当するB-セルが抗体生産能を有する場合には、そのような抗体を十分に除去するのが好ましい。しかしながらヒト/ヒトモノクロナル抗体であるので、他人に投与してもその抗原性は低く、前記のマウス/マウスモノクロナル抗体におけるような重大な危険はない。

最も望まれる特性は、患者本人のリンパ系が生産する抗体と同一形質の抗原特異的抗体(免疫グロブリン)をヒト体外で量産させ、再び本人の体内に、何等の副作用の危惧なしに戻すことを可能とすることである。そして、本発明方法によつてはじめて、そのような抗原特異的免疫グロブリンをヒト体外で工業的に生産させることが可能となった。

本発明方法によれば、例えば、以下に例示するような広汎な分野において利用できる抗原特異的ヒト免疫グロブリンをヒト体外で生産することができる。

例えば、ウイルス、バクテリア、寄生虫などの外来の抗原に対する抗体をヒト体外で生産することができる。更に、癌などの自己体内で変化した細胞(altered self)に対する抗体をヒト体外で生産することができ、また更に、アレルギー性疾患にみられるような低分子乃至高分子化学物質(ケミカル・メディエーター)で惹き起されるアレルギー性疾患に対して、それら物質の作用を抑制する抗体をヒト体外で生産することが可能となる。

癌に対する例について、更に詳しく例示すると、ヒト体外で量産された癌特異的抗体それ自体の作用で癌細胞の増殖抑制、癌細胞の死滅を行わせたり、ヒト体外で量産された癌組織認識抗体に補体もしくはT-リンパ球の助けをかりて癌細胞の増殖抑制や癌細胞死滅のはたらきをさせたりす

ることができる。更にまた、ヒト体外で量産された癌特異的抗体をキャリアーとして利用して例えば化学療法剤結合-ヒト・モノクロナル抗体、インターフェロン結合-ヒト・モノクロナル抗体、高分子毒素結合-ヒト・モノクロナル抗体、薬物入りボゾーム結合-ヒト・モノクロナル抗体などの形で癌細胞の増殖抑制や死滅のはたらきをさせたりするのに有用である。また、本発明方法で得られるヒトモノクローナル抗体をキャリアーとして利用し、これに放射線感受性物質を結合させて患者に投与し、癌細胞に選択的に集まる性質を利用して患部を検知し、放射線療法に利用することができる。このような癌に対する利用に際しては、ヒト・モノクロナル抗体として完全な抗体を用いてもよいし、抗体を化学的な手法で特異的抗原認識部位を含むより小さな分子に切断して用いたり、或はそのような小さな分子もしくは特異的抗原認識部位のみを他の抗体の非特異的抗原認識部分と結合させて、より有効性のある修飾ヒト・モノクロナル抗体を化学的手法で創製することもできる。

さらに、本発明方法で得ることのできるヒト免疫グロブリンを利用して人の抗原性疾患の診断、予防などに利用することができる。この利用態様によれば、病原体あるいは疾患に伴って生体内に現われる生体高分子に対する特異的抗体を本発明方法により作製し、得られた抗体に例えばアイソトープもしくは類似の追跡物質（感受性物質）を結合させ、該抗体の存在を検出できるようにしておき、これを体内に注入してその結合場所を検出することにより体内の病巣、病源体を検知したり、体外で組織の抽出液の中に存在する抗原を検出定量したりする方法で病気の診断、予防に利用することができる。このような方法によつて、例えば癌患者の手術後の転移の様子をモニターしたり、癌の早期発見に利用したり、或はまた癌の治癒の程度を確認したりすることができる。

また、組織培養されたヒト細胞に対して、本発明により得ることのできるヒト/ヒト単一抗体がどのような作用を示すかを調べることによつて、抗体の医療への応用に役立つ基礎知識、たとえば細胞の増殖や分化におよぼす因子の解明、細胞構成成分の定性と定量などの細胞生物学的基礎知識の解明に有用であり、さらに、酵素、蛋白質、核

酸の精製、生体高分子の構成と機能の解析、DNA、RNAの抽出など広い生化学領域において利用することもできる。

以下、実施例により、本発明方法実施の数例をさらに詳しく述べる。

実施例 1

子宮頸部に扁平上皮癌をもつ患者から、子宮体全体およびリンパ節を摘出する手術の際に、癌組織およびリンパ節を入手した。後者のリンパ節をハサミで細く切りきざみ、内部のリンパ球を培養液 (RPMI-1640) 中に分散させ、続いて2重のガーゼを用いてろ過を行い、脂肪層を除いた後にろ過中の細胞 (リンパ球>80%) を遠心法によつて集める〔ヒトB-Cellドナーを含むヒトリンパ球分画 (ドナーB-セル)〕。その後このリンパ球分画を10%仔牛血清および10%のグリセロールを含むRPMI1640培地中で凍結 (-70°C) し、細胞融合を行う日まで保存した。

ドナーリンパ球と免疫グロブリン生産能を実質的に欠損している親ヒトB-セル (UC729-6) のそれぞれを 1×10^7 個および 5×10^6 個混合し、35%ポリエチレングリコールの存在下に10%の仔牛血清を含むRPMI-1640培地中で融合を完了させる。その後、800G、10分間の遠心処理を行つてポリエチレングリコールを除き、新たに10%仔牛血清を含むRPMI-1640およびヒポキサンチン/アミノプテリン/チミジン (HAT) を含む培地を加える。この細胞群を含む培養液200 μ l (この中には 1.5×10^5 個のCellを含む) づつを96個の穴をもつマイクロプレートに分注し、約2週間37°C、5%CO₂インキュベーターで培養した。この間、HATを含む10%仔牛血清-RPMI-1640培地を3日に1回交替した。親B-セル (UC729-6) はアミノプテリン存在ではヒポキサンチンホスホリボシールトランスフェラーゼを欠損しているため、生きることが出来ない。またリンパ球(A)は通常の培地たとえばRPMI-1640+10%仔牛血清中では永続的に増殖し生きのびることができない。よつて、HATを含む培地で永続的に増殖した細胞はリンパ球(A)とB-Cell(B)の融合した細胞である。2週間培養の後、96個のマイクロプレート6個にハイブリドーマのクローンが見られた。この6個のハイブリドーマのうち2個のハイブリドーマ (それぞれ、CLN/SUZ H5 及びCLN/

19

SUZ H11と称す) がヒト免疫グロブリン (Hulg) を産生していることを固定化ラジオイムノアッセイおよび固定化酵素抗体法を用いて確めた。以下その方法を説明する。

ガラスフィルターの上に、ハイブリドーマの培養液を滴下 (50ul) し、乾燥することによって、培養液中の蛋白質を固定化する。その後、 ^{125}I 結合抗ヒト免疫グロブリン血清 (ラジオイムノアッセイ法) あるいはペルオキシダーゼ結合抗ヒト免疫グロブリン血清を滴下 (50ul) して (酵素抗体法)、培養液中にあるべきヒトIgと結合させる。室温で30分間反応後、生理食塩水でよく洗った後、ラジオイムノアッセイの場合はガラスフィルターの上に残った ^{125}I の放射能をγ-カウンターで定量することによって、ハイブリドーマ培養液中に含まれるヒトIgの量を知る。一方、酵素抗体法の場合は、さらに過酸化水素とO-フェニレンジアミンを含む基質溶液を加え、暗室で30分間反応させる。もしガラスフィルターの上にペルオキシダーゼ結合抗ヒトIg血清が残っている場合、すなわちガラスフィルターの上でヒトIg、抗ヒトIg血清が反応した場合には吸光度490nmで検出される黄色の基質反応物が生産される。この量を吸光度計を用いることによって測定し、ハイブリドーマ培養液中に含まれるヒトIgの量を知る。ハイブリドーマ培養液中にヒトIgが存在しない場合には、抗ヒトIg血清は洗滌の段階でガラスフィルターを通して洗い流される。

以上の測定方法を用いた結果、CLN/SUZ H5はヒトIgMを生産しており、CLN/SUZ H11はヒトIgGを生産していることが分った (ドナーB-セルと同形質のIg)。2週間後に、CLN/SUZ H5及びCLN/SUZ H11のそれぞれを24個の穴をもつマイクロプレート (2ml/穴) に植えかえた後さらに1週間培養を続けた。融合後3週間目に、培養液の上清を採取、種々の株化細胞を標的細胞としてヒト/ハイブリドーマから生産されるIgの特異性を調べた (一定の形質をもつIgまたは特定の形質をもつIg)。

その方法を以下説明する。

人間の種々の株化培養細胞 (これらはATCCより入手可能) をDME:F-12=1:1の合成培地に10%仔牛血清を加えた培地で培養する。細胞の数が $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ になった段階で、トリブ

20

シンを用いずに細胞をシャーレの底面から剥がし、底部にガラスフィルターをもつ96穴のマイクロタイタープレートを用いて一定数 (約 5×10^4) をガラスフィルターの上に載せ、乾燥して、細胞をガラスフィルターの上に固定化する。その後、CLN/SUZ H5およびCLN/SUZ H11のそれぞれについて、培養上清 (50ul) を細胞の上に滴下し、室温で反応させた後、 ^{125}I -結合ヒトIg血清、あるいはペルオキシダーゼ結合ヒトIg血清を滴下して室温で反応させる。十分に洗滌をおこなった後、先述のラジオイムノアッセイ法および酵素抗体法で述べた方法によって細胞に結合した培養液中のヒトIgの量を測定する。

以下の方法によってCLN/SUZ H5のIgMの標的細胞特異性およびCLN/SUZ H11のIgGの標的細胞特異性をそれぞれ調べた結果、CLN/SUZ H5の培養液中のIgM、およびCLN/SUZ H11の培養液中のIgGは、いずれも子宮頸部癌由来の、株化細胞HelaおよびCaskに対して結合力を有しており、本発明者の検討によれば子宮頸部癌以外の株化細胞、A431 (肺癌)、リンパ性腫瘍およびW1・38 (正常ヒト線維芽細胞) 等とは結合力を有していなかった。

すなわち、ドナーB-セルは、体内に子宮頸部癌をもつ患者から採取されたものであるので、細胞融合法によって作り出された自己増殖性をもつハイブリドーマのクローンからは、ドナーB-セルと同形質のかつ特定の抗原決定部位をもつモノクローナル (単一) 抗体を生産していることを示している。一般に、癌をもつ患者の体内で癌組織は、抗原として働き、同患者の免疫監視機構によって、癌特異的抗体を生産しうる能力があることをしめしている。

同患者より、採取した癌組織を培養に移した細胞を標的細胞として用いて、CLN/SUZ H5及びCLN/SUZ H11の特異性を上記と同様の方法で調べた結果、結合力を有していることが分った。

約3週間後に、ハイブリドーマの培地からHATを除きRPMI-1640+10%仔牛血清で培養、倍加時間37時間で、CLN/SUZ H5は $2.4 \mu\text{g}$ のIgM (HuMoIgM) / 10^6 セル/ml/dayの量でヒトIgMを生産し続けており、CLN/SUZ H11は $2.6 \mu\text{g}$ のIgG (HuMoIgG) / 10^6 セル/ml/dayの

量でヒトIgGを生産し続けている。

ハイブリドーマの多量培養液を50%の硫酸アンモニウムで沈殿させ、粗Ig分画を集めた。得られた沈殿を生理食塩水に溶かし、IgGはヒツジの抗ヒトIgG血清中のIgGを用い、IgMはヒツジの抗ヒトIgM血清中のIgGを結合させたセファロースを用いてアフィニティクロマトグラフィーの手法で精製された。収率はCLN/SUZ H5の培養液 1 ℓ から2.2mgのIgM、CLN/SUZ H11の培養液 1 ℓ から3.0mgのIgGが得られた。これらのアフィニティクロマトグラフィーを用いて精製した、Ig標品をSDS-電気泳動法で分析した結果、ヒトIgと同形質の分子量15万のIgG(CLN/SUZ H5)および分子量18万(単量体)のIgM(CLN/SUZ H11)を生産していることが確かめられた。また、両ヒトハイブリドーマは、Nude mouseの腹腔内で増殖させることが可能であり、腹水 5 ml中に3~10mgのヒトIgを生産させることができる。

実施例 2

子宮頸部に上被性腺癌をもつ患者から、手術の際にリンパ節を入手、実施例 1 で用いた方法と同

様の方法でリンパ球を調製した。本実施例ではリンパ球を凍結保存することなしにRPMI-1640+10%仔牛血清中で1日培養した後、親B-セル(UC729-6)を用いて、実施例 1 と同様の方法で細胞融合を行つた。その結果、96穴のうち16個にハイブリドーマのクローンが認められ、ラジオイムノアッセイを用いる検出方法によつて16個のうち5個がヒトIgMを生産しており、16個のうち2個がヒトIgGを生産していることが確かめられた。

実施例 3

子宮頸部に扁平上皮癌をもつ患者からヘパリン存在下末梢血(50ml)を採取し、フィコールによつて末梢血中のリンパ球を分離し、実施例 1 で述べた方法によつて、細胞融合日まで凍結保存を行つた。融合日に、融解してRPMI-1640でドナーB-セルを2回洗つた後、実施例 1 と同様の方法で細胞融合を行つた。その結果96個のマイクロタイタープレートのうち4個にハイブリドーマのクローンが見出され、4個のうち1個にヒトIgMの生産が検出された。